

明細書 抗体の用途

技術分野

本発明は、アルツハイマー病などの予防・治療剤あるいは診断剤などに関する。更に詳しくは、 β -アミロイド ($A\beta$) またはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を含有してなるアルツハイマー病などの予防・治療剤あるいは診断剤などに関する。

背景技術

アルツハイマー病による老人性痴呆は大きな社会的問題となっており、アルツハイマー病の予防・治療方法の早期確立が望まれている。アルツハイマー病患者の脳に特徴的な病変として、老人斑アミロイドの過剰な形成および神経原線維変化が知られており、これらのうち老人斑の主要な構成成分の一つが β -アミロイドまたはその誘導体である。

β -アミロイドは、約40～43個のアミノ酸からなるペプチドであり、アミロイド前駆体蛋白質 (Amyloid Precursor Protein : 以下、APPと称する) の細胞膜貫通領域の近傍にコードされている。各 β -アミロイドのアミノ酸配列は以下のとおりである。

β -アミロイド (1-38) = 配列番号 : 1

β -アミロイド (1-39) = 配列番号 : 2

β -アミロイド (1-40) = 配列番号 : 3

β -アミロイド (1-41) = 配列番号 : 4

β -アミロイド (1-42) = 配列番号 : 5

β -アミロイド (1-43) = 配列番号 : 6

さらに最近では、 β -アミロイドのなかでも、大脳実質中 (老人斑) には β -アミロイド (1-42) が主に早期から沈着し、一方脳血管には β -アミロイド (1-40) が主に沈着する (アミロイドアンギオパチー) ことが報告され [アーチブス オブ バイオケミストリー アンド バイオフィジックス (Arch.

Biochem. Biophys.) , 301, 41-53, 1993]、 β -アミロイド(1-42)、 β -アミロイド(26-42)、 β -アミロイド(26-43)、 β -アミロイド(34-42)などのC端部分を含むペプチドが種となって、水溶性の β -アミロイド(1-40)などの沈着を招くことなどが示唆されている[Biochemistry) , 32, 4693-4697, 1993]。したがって、 β -アミロイド(x-42)の沈着がアルツハイマー病においては最も重要な病因と考えられており、このような報告から、 β -アミロイド(x-40)と β -アミロイド(x-42)との沈着様式の相違がアルツハイマー病に大きく関与していると考えられる。

このため、 β -アミロイド(x-40)と β -アミロイド(x-42)とを感度よく分別定量することが重要であると考えられ、 β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体ならびに該抗体を用いるC端部疎水的領域を有する β -アミロイドの測定方法がWO 94/17197号公報に報告されているが、該抗体による直接的なアルツハイマー病の予防・治療効果は知られていない。

一方、 β -アミロイドワクチンによる直接的なアルツハイマー病の治療に関しては、例えば、ネイチャー(Nature), 400, 173-177, 1999、ネイチャー メディシン(Nature Medicine), 9 (4), 448-452, 2003などに報告があるが、ヒトAPPトランスジェニックマウスなどを用いた前臨床試験で、老人斑の減少、学習能力の向上などの成功をもたらし、画期的な治療法として期待されたにもかかわらず、最近の第II相臨床試験において、予期せぬ重篤な副作用を招いた。死亡例をももたらした重篤な副作用の主たる原因は、通常のアミロイド病には見られないCD4⁺リンパ球の脳内浸潤による脳炎の発症と考えられている。

免疫療法の結果、脳内に沈着した老人斑が劇的に減少し、認知能力の改善も見られることはヒトでも確認されているため[ニューロン(Neuron), 38, 547-555, 2003]、この長所を生かしつつ副作用を回避するための選択肢のひとつとして、抗 β -アミロイド抗体を末梢投与する受動免疫が考えられ、モノクローナル抗体を用いた動物レベルでの検討が行われている[サイエンス(Science), 295, 2264-2267, 2002、ネイチャー ニューロサイエンス(Nature Neuroscience), 5,

452-457,2002]。しかし、脳アミロイドアンギオパチー（CAA）モデル・マウスを用いた検討では、抗N末端 β -アミロイド抗体の投与により、CAAに起因する脳血管からの出血の増悪が報告されている〔サイエンス(Science), 298, 1379, 2002]。]

β -アミロイドのN末端または中間部をエピトープとする抗体を用いた動物レベルでの受動免疫の実験においては、血中 β -アミロイド濃度の上昇は報告されているが〔サイエンス (Science), 295巻, 2264-2267頁, 2002年、ネイチャー ニューロサイエンス (Nature Neuroscience), 5巻, 452-457頁,2002年、ネイチャー メディシン (Nature Medicine), 8, 1263-1269, 2002、およびプロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンスズ オブ ザ ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA), 100, 2023-2028, 2003]、凝集性の高い β -アミロイド ($x-42$) の血中濃度を特異的に上昇させたという免疫療法の報告はない。

発明の開示

β -アミロイドがアルツハイマー病の原因物質の一つである可能性が指摘され、 β -アミロイドに深い関心が寄せられているにもかかわらず、有効な予防・治療法が確立されていないのが現状である。また、アルツハイマー病の免疫療法に関しても、 β -アミロイドのN端側、中間部、または β -アミロイド ($x-40$) のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体では、例えば、脳血管壁に沈着した β -アミロイド ($x-40$) (CAA) に対する炎症を惹起し、脳内出血をもたらす危険があるなどの点を考慮すると、必ずしも十分に安全なアルツハイマー病の予防・治療方法であるとは言えない。

このように、より有効でかつ安全なアルツハイマー病の予防・治療法が切望されているのが現状である。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、 β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体BC-05aをアルツハイマー病のモデル・マウスに皮下投与した所、意外にも、脳内の β -アミロイドの沈着が抑制され、 β -アミロイド ($x-40$) の血液中の濃度を

増加させることなく、 β -アミロイド (x-42) のみの血液中の濃度を選択的に増加させることを見出し、これらの知見に基づいて、更に研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体を含有してなるアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤、

(2) アルツハイマー病の予防・治療剤である前記(1)記載の剤、

(3) 抗体が配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である前記(1)記載の剤、

(4) 抗体が配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体である前記(1)記載の剤、

(5) β -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである前記(1)記載の剤、

(6) β -アミロイドが配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである前記(1)記載の剤、

(7) β -アミロイドの誘導体が、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、または配列番号：5で表されるアミノ酸配列の4番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドである前記(1)記載の剤、

(8) β -アミロイドの誘導体が、配列番号：1ないし配列番号：6で表される各々のアミノ酸配列から1番目～10番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチドである前記(1)記載の剤、

(9) β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドが、各 β -アミ

ロイドのN端のアミノ酸から数えて25番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである前記(1)記載の剤、

(10) 抗体が配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である前記(1)記載の剤、

(11) 抗体が配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-42)を認識する抗体である前記(1)記載の剤、

(12) 抗体が、BA-27(FERM BP-4139)で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体BA-27aである前記(1)記載の剤、

(13) 抗体が、BC-05(FERM BP-4457)で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体BC-05aである前記(1)記載の剤、

(14) 抗体が、脳血液関門を透過する抗体である前記(1)記載の剤、

(15) 抗体が、形成された老人斑から β -アミロイドを引き抜きうる抗体である前記(14)記載の剤、

(16) β -アミロイドの脳内での凝集または沈着の抑制剤である前記(1)記載の剤、

(17) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの血中濃度を特異的に上昇させうる前記(1)記載の剤、

(18) 抗体が、脳血液関門を透過しない抗体である前記(1)記載の剤、

(19) 抗体が、末梢中の β -アミロイドを末梢で捕捉しうる抗体である前記(18)記載の剤、

(20) 哺乳動物に対して、 β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療方法、

(21) アルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤を製造するための β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分

ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の使用、

(22) 抗体が、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-42)を認識するが、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-38)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-39)および配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-40)を認識しない抗体である前記(1)記載の剤などを提供する。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる抗 β -アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、BA-27は平成4年12月22日から財団法人発酵研究所(IFO)(大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686))にIFO 50387として、平成5年1月7日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)[現、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566))]にFERM BP-4139として寄託されている。

また、本発明で用いられる抗 β -アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、BC-05は平成5年11月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)[現、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566))]にFERM BP-4457として寄託されている。

なお、本明細書において、各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については、細胞名の後にaを付けた形で表記している。

本明細書において用いられる配列番号のうち、配列番号：1～配列番号：9は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

[配列番号：1] β -アミロイド(1-38)

[配列番号：2] β -アミロイド(1-39)

[配列番号：3] β -アミロイド(1-40)

〔配列番号：4〕 β -アミロイド（1-41）

〔配列番号：5〕 β -アミロイド（1-42）

〔配列番号：6〕 β -アミロイド（1-43）

〔配列番号：7〕 β -アミロイド（1-28）

〔配列番号：8〕 β -アミロイド（25-35）

〔配列番号：9〕 β -アミロイド（35-43）

本明細書におけるタンパク質（ポリペプチド）は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基、カルボキシレート、アミドまたはエステルの何れであってもよい。

本発明における β -アミロイドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-38）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-39）、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-40）、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-41）、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-42）または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-43）など（好ましくは、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-42）など）が用いられる。

本発明における β -アミロイドの誘導体としては、上記 β -アミロイドのN端部のアミノ酸がそれぞれ1ないし17残基程度欠落したもの、L-アスパラギン酸がL-イソアスパラギン酸、D-イソアスパラギン酸またはD-アスパラギン酸に異性化したもの、N端部にピログルタミン酸を有するもの、上記 β -アミロイドのN端部から1番目～10番目のアミノ酸が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したものなどが用いられる。具体的には、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸

配列の第4番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチド（例えば、 β -アミロイド（17-40）、 β -アミロイド（18-40）など）などが用いられる。これらの β -アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物より自体公知の方法で調製することもできるし、市販の天然精製標品であってもよい。また、合成ペプチドを用いてもよい。

本発明における β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドとしては、例えば β -アミロイドのN端のアミノ酸から数えて25番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドが挙げられる。

上記した β -アミロイドまたはその誘導体は、例えば、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩（好ましくは生理学的に許容される酸付加塩）などとして用いてもよく、この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明における β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体（以下、単に抗体と称することがある）としては、例えば β -アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（1-28）で表される β -アミロイドのN端側の部分ペプチド）を認識しない抗体などが用いられる。また、 β -アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（25-35）で表される β -アミロイドの中心部分の部分ペプチド）を認識しない抗体； β -アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（35-43）で表される β -アミロイドのC端側の部分ペプチド）を認識しない抗体など

であってもよい。より具体的には、これらの抗体の中でも、

(i) 配列番号：8 および配列番号：9 で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（25-35）および β -アミロイド（35-43））を認識しない抗体、

(ii) 配列番号：8 で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（25-35））を認識しないが、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（35-43））を認識する抗体などが好ましい。

上記 (i) の抗体の中でも、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-38）、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-39）および（または）配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-40）を特に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-38）、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-39）、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-40）を認識するが、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-42）を認識しない抗体が好ましい。

また、上記 (ii) の抗体の中でも、アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれる β -アミロイド（特に、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-42））を特に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：5 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-42）を認識するが、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-38）、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-39）および配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-40）を認識しない抗体が好ましい。

上記 (i) の抗体の代表例としては、BA-27a で標示されるモノクローナル抗体（WO 94/17197号公報参照）があり、上記 (ii) の抗体の代表例としては、BC-05a、BC-15a、BC-65a、BC-75a、BC-55a（特に、BC-05a が好ましい）で標示されるモノクローナル抗体（WO

94/17197号公報参照)がある。

抗体の抗原の調製法、および抗体の製造法については、自体公知の方法、例えば、WO 94/17197号公報に記載の方法やそれに準ずる方法を用いることができるが、以下に、その例を示す。

(1) 抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば β -アミロイドまたはその誘導体、 β -アミロイドまたはその誘導体を加水分解して得られる部分ペプチド、 β -アミロイドと同一の抗原決定基を1種あるいは2種以上有する合成ペプチドなど何れのものも使用することができる(以下、これらを単に β -アミロイド抗原と称することもある)。該 β -アミロイドまたはその誘導体としては、前述したものが用いられる。これら β -アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物から自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製することもできるし、また市販の天然精製標品であってもよい。また、合成ペプチドを用いてもよい。

前記 β -アミロイドまたはその誘導体またはそれらの塩は、公知の方法、例えばWO 02/06483号公報に記載の方法に準じて製造でき、さらに、(a) 例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の組織または細胞から公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製、(b) ペプチド・シンセサイザー等を使用する公知のペプチド合成方法で化学的に合成、(c) 所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造される。

(a) 該哺乳動物の組織または細胞から β -アミロイド抗原を調製する場合、その組織または細胞をホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

(b) 化学的に β -アミロイド抗原を調製する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製した β -アミロイド抗原と同一の構造を有するもの、などが用いられる。

(c) DNAを含有する形質転換体を用いて所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を製造する場合、該DNAは、公知のクローニング方法〔例えば、Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法など〕に従って作製することができる。該クローニング方法とは、(1) 所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または(2) 所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法により所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法などが挙げられる。

該β-アミロイドを加水分解して得られる部分ペプチドとしては、例えば配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するβ-アミロイド(1-43)などをアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼなどのエキソプロテアーゼによりN末端および(または)C末端から順次加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物、あるいはβ-アミロイド(1-43)を種々のエンドペプチダーゼにより加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物などが用いられる。この方法でβ-アミロイド(1-42)を作製した場合、標品中にβ-アミロイド(1-41)および(または)β-アミロイド(1-43)が混合している場合がある。該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製したβ-アミロイド抗原と同一の構造を有するものや、β-アミロイド(1-43)などのアミノ酸配列において3個以上、好ましくは6個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチド(以下β-アミロイド関連合成ペプチドと略す)などが用いられる。

上記合成ペプチドは、公知の常套手段で製造することができ、固相合成法、液相合成法のいずれによっても製造することができる。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護

基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。具体的な、公知の縮合方法や保護基の脱離方法としては、例えばB. Merrifield [ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ (J. Am. Chem. Soc.) ,85. 2149(1963)]、M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti [ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York, 1966年]、Schroder および Lubke [ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York, 1965年]、泉屋信夫他 [ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985年]、矢島治明および榊原俊平 [生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV, 205, 1977年] などが用いられる。例えば、固相法により β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチドを合成する場合には、不溶性樹脂として当該技術分野で知られたもの (例えば、クロロメチル樹脂、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂など) の何れかの樹脂を用い、 β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチドのC末端側から保護アミノ酸を常法に従って順次縮合する。次いで、フッ化水素処理で全保護基を除去して、高速液体クロマトグラフィーなどのそれ自体公知の方法による精製後、目的とする β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチドを得ることができる。また、N-保護アミノ酸としては、 α -アミノ基はBoc基で保護し、さらに例えばセリンおよびスレオニンの水酸基はBzl基で保護し、グルタミン酸、アスパラギン酸の ω -カルボキシル基はOBzl基で保護し、リジンの ϵ -アミノ基はC1-Z基で保護し、チロシンの水酸基はBr-Z基で保護し、アルギニンのグアニド基はTos基で保護し、ヒスチジンのイミダゾール基はBom基で保護する方法で製造することができる。また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオ

キシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはクロトリチル樹脂、オキシム樹脂、4-ヒドロキシ安息香酸系樹脂等を用い、部分的に保護したペプチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObtなど）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN, N'-ジメチルホルムアミド、N, N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～約50℃の範囲から適宜選択される。活

性化されたアミノ酸誘導体は通常約 1.5 ないし約 4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシルおよびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、Cl-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホン、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、

2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえばPd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃~40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド(またはアミノ酸)とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得

ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

β -アミロイド抗原は、凝集しやすいため、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、該 β -アミロイド抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体および担体（キャリアー）と β -アミロイド抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合あるいは吸着させた β -アミロイド抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。天然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2,4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN,N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル（SPDP）など）を反応させ

た後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

(2) モノクローナル抗体の作製

β -アミロイド抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウス、ラットなどが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、 β -アミロイド抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、抗 β -アミロイドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗 β -アミロイド抗体価の測定は、例えば後記の標識化 β -アミロイドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓細胞数との好ましい比率は、通常1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、通常20～40℃、好ましくは30～37℃で通常1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗 β -アミロイド抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチド

ドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗 β -アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した β -アミロイドを加え、固相に結合した抗 β -アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗 β -アミロイドモノクローナル抗体の選別、育種は通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、10～20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地（例、RPMI 1640）で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗 β -アミロイド抗体価の測定と同様にして測定できる。

抗 β -アミロイドモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインA、プロテインGあるいはKAPTIV-AE（TECNOGEN S.C.P.A.社）などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など〕に従って行われる。

また、 β -アミロイドの一部領域と反応する抗 β -アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ、および、 β -アミロイドとは反応するがその一部領域とは反応しない抗 β -アミロイドモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別は、たとえばその一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

以上のようにして、ハイブリドーマ細胞を温血動物の生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から抗体を採取することによって、本発明の抗体を製造することができる。

このようにして得られる抗 β -アミロイドモノクローナル抗体は、アルツハイマー病、軽度認知障害（MCI）、脳アミロイドアンギオパチー（CAA）など

(好ましくは、アルツハイマー病など)の予防・治療剤(進展抑制剤も含む)として使用することができる。また、該予防・治療剤としては、 β -アミロイドの脳内での凝集または沈着の抑制剤、配列番号:5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの血中濃度の特異的な上昇剤などであることが好ましい。

これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子の $F(ab')_2$ 、Fab'またはFab画分などを用いてもよい。また、これらの目的に用いられる本発明の抗体としては、脳血液関門(BBB)を透過する抗体が好ましく、なかでも、 β -アミロイドの沈着を抑制する抗体、 β -アミロイドのオリゴマー形成を阻害する抗体、あるいは形成された老人斑から β -アミロイドを引き抜く抗体(あるいは脳内に形成された老人斑を消失させる抗体)などが好ましい。あるいは、脳血液関門(BBB)を透過しない抗体であってもよく、この場合は、末梢中の β -アミロイドを末梢で捕捉し、脳内から末梢への β -アミロイドの排出を促進しうる抗体であることが好ましい。

また、上記のように脳血液関門(BBB)を透過し、形成された老人斑の β -アミロイドと結合しうる抗体は、アルツハイマー病、軽度認知障害(MCI)などの体内での直接的な診断剤として用いることもできる。ごく初期のアルツハイマー病、軽度認知障害(MCI)に見られるびまん性老人斑は、 β -アミロイド(x-42)を主な構成成分とすることが知られているため、特に β -アミロイド(x-42)のC端部に特異的な抗体、抗体分子の $F(ab')_2$ 、Fab'またはFab画分などとびまん性老人斑との、体内での直接的な結合を高磁場MRIなどを用いて画像化することにより、これまで困難であったアルツハイマー病や軽度認知障害(MCI)の早期診断が可能になると考えられる。

本発明の抗体を含有するアルツハイマー病、軽度認知障害(MCI)、脳アミロイドアンギオパチー(CAA)など(好ましくは、アルツハイマー病など)の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人のアルツハイマー病の治療のために使用する場合には、本発明の抗

体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1週間に1~5回程度、好ましくは1ヶ月に1~4回程度、非経口投与するのが好都合である。経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene（50mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合する

ことによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤等が例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常約5～500mg、とりわけ注射剤では約5～100mg、その他の剤形では約10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

P A M	: フェニルアセタミドメチル
B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B z l	: ベンジル
O c H e x	: シクロヘキシルエステル
O B z l	: ベンジルエステル
T o s	: p-トルエンシルホニル
H O B t	: 1-ベンゾトリアゾール
M e B z l	: 4-メチルベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
T F A	: トリフルオロ酢酸
D M F	: N,N-ジメチルフォルムアミド
G l y	: グリシン

A l a	: アラニン
V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
S P D P	: 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル
G M B S	: N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド
B S A	: ウシ血清アルブミン
B T G	: ウシチログロブリン
E I A	: エンザイムイムノアッセイ
H P L C	: 逆相高速液体クロマトグラフィー
H R P	: 西洋ワサビパーオキシダーゼ
F B S	: ウシ胎児血清
d - F B S	: 透析済みウシ胎児血清
T M B	: 3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン

H/HBSS：ヘペスバッファードハンクスバランス溶液

本明細書において用いられる配列番号は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：1〕 β -アミロイド（1-38）

〔配列番号：2〕 β -アミロイド（1-39）

〔配列番号：3〕 β -アミロイド（1-40）

〔配列番号：4〕 β -アミロイド（1-41）

〔配列番号：5〕 β -アミロイド（1-42）

〔配列番号：6〕 β -アミロイド（1-43）

〔配列番号：7〕 β -アミロイド（1-28）

〔配列番号：8〕 β -アミロイド（25-35）

〔配列番号：9〕 β -アミロイド（35-43）

以下に、実施例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例で用いたモノクローナル抗体BC-05aおよびBA-27aは、WO 94/17197号公報の実施例7に記載の方法に従って得た。

実施例1

（1）サンドイッチ法・EIAによる $A\beta$ x-40、 $A\beta$ x-42の測定

マウスモノクローナル抗体BNT-77a（Asami-Odaka A. et al., Biochemistry, 34巻, 10272-10278頁, 1995年）は、WO 94/17197号公報の実施例7に記載の方法に準じ、 β -アミロイド(11-28)をBALB/Cマウスに免疫することにより得た。これを15 μ g/ml含む0.1M 炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100 μ lずつ分注し、4°Cで24時間放置した。ウェルの余剰の結合部位を、PBSで4倍希釈したブロックエース（大日本製薬）300 μ lを加え、4°Cで24時間放置することにより不活化した。 $A\beta$ x-40の測定は、上記のように1次抗体を固定化したプレートに、バッファーEC〔10%ブロックエース、0.2% BSA、0.4M NaCl、0.05% CHAPS、2mM EDTA、0.05% NaN_3 を含む0.02Mリン酸緩衝

液、pH7] で希釈したA β 1-40 (ペプチド研究所) の希釈系列および被験試料 100 μ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、2次抗体としてバッファーC [1% BSA、0.4M NaCl、および2mM EDTAを含む0.02M リン酸緩衝液、pH7] で1000倍に希釈したBA-27a-HRP (WO 94/17197号公報参照) を100 μ l加え、室温で6時間反応させた。PBSで洗浄した後、TMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム (KIRKEGAARD & PERRY LAB, INC) 100 μ lを加え室温で10分間反応させた。反応を1M リン酸100 μ lを加えることにより停止させた後、450nmの吸光度をプレートリーダー (SPECTRAMAX190、Molecular Device社) で測定することにより固相上の酵素活性を求めた。A β x-42の測定は、上記で作製したBNT-77a固定化プレートにA β 1-42 (ペプチド研究所) の希釈系列および被験試料を加え、2次抗体としてBC-05a-HRP (WO 94/17197号公報参照) を用いることにより、A β x-40と同様に測定した。

(2) BA-27aまたはBC-05aの腹腔内投与後のBALB/Cマウス血漿および脳脊髄液中のA β x-40およびA β x-42の濃度変化

3ヶ月齢、BALB/Cマウス19匹で上記抗体の効果を検討した。0.5mgのBA-27aと0.5mgのBC-05aをそれぞれ7匹と6匹のマウスの腹腔に投与した。残りの非投与6匹をコントロールとして検討した。投与後16時間後に、エーテル麻酔下で、マウスから血漿(plasma)と脳脊髄液(CSF)を採取し、A β x-40とA β x-42を計測した。さらに1週間おきに4回、BC-05aを腹腔投与したマウスの血漿を採取し、A β x-42を測定した。このうちの血漿10 μ lと5 μ gのDynabeads M280 anti-mouse Ig (Dyna)を2時間室温で反応させた後に上清を回収し、血漿中の免疫グロブリン非結合型A β x-40とA β x-42および0.2M Glycine pH2.8で溶出した免疫グロブリン結合型をA β x-40とA β x-42を測定した。

血漿A β x-40は、BA-27a投与群では 137.3 ± 2.2 fmol/ml、BC-05a投与群では 3.3 ± 1.2 fmol/ml、正常対照群では 3.4 ± 1.8 fmol/mlであった。

脳脊髄液A β x-40は、BA-27a投与群では 670.8 ± 252.6 fmol/ml、BC-05a投与群では 166.5 ± 140.1 fmol/ml、正常対照群では 246 ± 184.3 fmol/mlであった。血漿A β x-42は、BA-27a投与群では 0.5 ± 0.4 fmol/ml、BC-05a投与群では 60.7 ± 7.1 fmol/ml、正常対照群では 0.2 ± 0.2 fmol/mlであった。

脳脊髄液A β x-42は、BA-27a投与群では測定感度以下、BC-05a投与群では0.6 \pm 0.4fmol/ml、正常対照群では測定感度以下であった。

A β x-40は、BA-27a投与によって血漿で40倍、脳脊髄液で2.7倍と有意に上昇した(p<0.001)。BC-05a投与では血漿および脳脊髄液ともにA β x-40の上昇はみられなかった。

A β x-42は、BA-27a投与では血漿および脳脊髄液ともにA β x-42の上昇はみられなかった。BC-05a投与では血漿で304倍と有意に上昇し(p<0.001)、脳脊髄液では正常対照では測定感度以下であったものが、0.6 \pm 0.4fmol/mlと上昇した。

BC-05aを一ヶ月間、継続投与したマウスでは、血漿A β x-42のみ324.1fmol/mlと1621倍に増加しており、しかも、抗体結合型、抗体非結合型に免疫沈降法で分けて測定すると、増加したA β x-42のほぼ100%が抗体非結合型であった。

以上の結果は、抗A β 42C末端特異抗体BC-05aをマウス腹腔に投与すると、脳脊髄液A β x-42と血漿A β x-42を特異的にしかも著明に上昇させることを示している。血漿中に上昇したA β x-42は免疫グロブリン非結合型であることから、このA β x-42の上昇は、投与したBC-05aが血液中で結合しているA β x-42を測定したものではない。

したがって、投与されたBC-05aは脳内A β x-42のクリアランスを特異的に増加させて、脳脊髄液A β x-42と血漿A β x-42の増加を来したものと考えられる。

この結果はBC-05aを投与することにより、アルツハイマー病の発病開始因子であるA β x-42の脳内濃度を選択的に制御できること、さらに一度沈着して様々な病理過程を引き起こしている脳アミロイドA β x-42の沈着を選択的に解除し、改善しうることを示している。投与されたBC-05aが脳内のA β x-42と結合することを応用すれば、老人斑の選択的画像化やBC-05aの血管内投与による脳アミロイドA β x-42沈着量の選択的推定などの新たな診断法への応用も可能と考えられる。

実施例 2

(1) ビオチン化BC-05aおよびビオチン化マウスIgGの作製

BC-05a (10 mg/ml) 2 mlにsulfo-NHS-biotin (Pierce社) 水溶液 (2.4 mg/120 μ l) 40 μ lを添加し、攪拌しながら室温で30分間反応させた。反応液を希釈し4℃で2日間、PBS(-)に対して透析した後、抗体濃度を測定した。収率約70%。対照に用いるマウスIgG (和光純薬) も同様にビオチン化した。

(2) 若齢APP^{swTg} (Tg2576) マウスへのビオチン化抗体の短期連投、大脳可溶性画分の調製と脳内抗体濃度の測定

雌性Tg2576マウス (12週齢) (Science, 274巻, 99-102頁, 1996年) に対し、ビオチン化マウスIgGまたはビオチン化BC-05a (各0.5 mg/0.2 ml/マウス) を単回腹腔内投与し、24時間後に採血、灌流後大脳を採取、半切後凍結した(n=4-5)。血液にはプロテアーゼインヒビターカクテル (Complete、Roche社) とEDTA (終濃度4 mg/ml) を加えて混和し、遠心後の上清を血漿として凍結保存した。プロテアーゼインヒビターカクテルを含む50 mM トリス塩酸含有生理食塩水 (pH 7.5) (TSバッファー) を、大脳半球に重量の4倍量加えてホモジナイズし、300,000 x g、4℃で20分間超遠心した後の上清を大脳可溶性画分とした。これをアビジン固定化96ウェルプレート (Reacti-Bind NeutrAvidin Coated Plate, Pierce社) に添加し4℃で一晩反応させた。洗浄後、抗マウスIgG-HRP (Amersham社) を加えて室温で6時間反応させ、洗浄後HRPの基質 (TMB Microwell Peroxidase substrate system, KPL社) を加えた。1M 燐酸で反応停止後、プレートリーダーで450 nmの吸光度を測定し、付属の計算ソフト (SoftMAX) で脳内抗体濃度を算出した。血漿中の抗体濃度も同様に測定した。BC-05aを標品とすることにより得た検量線を作製し、上記(1)で得られたビオチン化BC-05aの血漿および脳内の濃度結果を表1に示す。

[表1]

	ビオチン化マウスIgG投与群		ビオチン化BC-05a投与群	
	(n=4)	(pmol/g wet tissue)	(n=5)	(pmol/g wet tissue)
血漿		1300±296		1030±94.8
大脳可溶性画分		6.42±0.475		4.75±0.056

mean \pm S.E.M.

これより、ビオチン化BC-05a およびビオチン化IgGのいずれを投与した場合でも、血漿の抗体濃度の0.5%前後が脳内に移行していることがわかる。

実施例 3

若齢APPswTg (Tg2576) マウスへのBC-05a 9ヶ月間連投、大脳抽出物の調製と血中・脳内A β 濃度の定量

雄性Tg2576マウス (10週齢) (Science, 274巻, 99-102頁, 1996年) に対し、マウスIgGまたはBC-05a (15週齢まで各0.5 mg/0.2 ml/マウス、16週齢以降各1.0 mg/0.2 ml/マウス) を週1回、52週齢 (12ヶ月齢) まで腹腔内投与した(n=9-10)。サンプリングは上記と同様の方法で行った。

大脳抽出物は可溶性画分と不溶性画分に分けて調製した。可溶性画分は実施例2と同様に調製し、超遠心後の沈殿をTSバッファーで洗った後、大脳半球重量の8倍量の6 M グアニジン塩酸含有50 mM トリス塩酸水溶液 (pH7.5) を加え、溶解させた。15000rpm、4℃で20分間遠心し、その上清を不溶性画分とした。A β 濃度の測定は実施例1記載の方法に従った。大脳不溶性画分はバッファーECで2000倍希釈したものをサンプルとした。

血漿中のA β 濃度は、希釈した血漿をそのまま定量する方法と、グアニジン塩酸でBC-05a複合体を解離させたのち、希釈したものを定量する方法の二通りで求めた。後者は、血漿10 μ lに8 M グアニジン塩酸含有50 mM トリス塩酸水溶液 (pH7.5) 30 μ lを加え、混和した後バッファーEC 560 μ lを加えて希釈したものをELISAのサンプルとした。

結果を表2に示す。

[表 2]

A β x-40	A β x-42
(pmol/g wet tissue)	(pmol/g wet tissue)

血漿（処理なし）	IgG投与群	3160 ± 302	389 ± 20.0
	BC-05a投与群	2270 ± 186	8810 ± 224
血漿（グアニジン処理）	IgG投与群	2990 ± 208	588 ± 29.0
	BC-05a投与群	2350 ± 128	18800 ± 1100
大脳可溶性A β	IgG投与群	2.23 ± 0.402	0.413 ± 0.0521
	BC-05a投与群	2.29 ± 0.27	0.643 ± 0.0687
大脳不溶性A β	IgG投与群	1650 ± 383	645 ± 102
	BC-05a投与群	1200 ± 347	442 ± 57.4

mean ± S.E.M.

単回投与と同様、血漿のA β 濃度はBC-05a投与により22倍から32倍に大きく上昇した。血漿をグアニジンで処理することにより、BC-05a投与群の血漿A β x-42濃度はさらに2倍程度上昇したことから、BC-05aは血中でのA β x-42の安定化に寄与している可能性が考えられる。

脳内可溶性A β x-40濃度に変化は見られなかったが、不溶性A β x-40濃度は減少傾向を示した。脳内A β x-42濃度は可溶性画分で有意に上昇し、不溶性画分で減少傾向を示した。

産業上の利用可能性

β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体を用いることによって、C端部疎水的領域を有する β -アミロイドを特異的に認識することができ、この抗体はアルツハイマー病などの予防・治療剤あるいは診断剤などとして有用である。さらに、 β -アミロイド（x-42）は脳脊髄液などの可溶性画分における比率が低いため、脳血液関門を介する脳外への運び出しは効率が低いと予想されるにもかかわらず、上記抗体は、 β -アミロイド（x-42）のみの血液中濃度を選択的に増加させ、脳内不溶性 β -アミロイド（x-42）を低下させる可能性がある。また、上記抗体は、 β -アミロイド（x-40）を主な構成成分とする脳血管アミロイドに対してほとんど

反応しないため、脳アミロイドアンギオパチーを含む脳血管からの出血を惹起しないと考えられる。

請求の範囲

1. β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体を含有してなるアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤。
2. アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項1記載の剤。
3. 抗体が配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である請求項1記載の剤。
4. 抗体が配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体である請求項1記載の剤。
5. β -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1記載の剤。
6. β -アミロイドが配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1記載の剤。
7. β -アミロイドの誘導体が、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、または配列番号：5で表されるアミノ酸配列の4番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1記載の剤。
8. β -アミロイドの誘導体が、配列番号：1ないし配列番号：6で表される各々のアミノ酸配列から1番目～10番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチドである請求項1記載の剤。
9. β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドが、各 β -アミロイドのN端のアミノ酸から数えて25番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである請求項1記載の剤。

10. 抗体が配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である請求項1記載の剤。
11. 抗体が配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-42）を認識する抗体である請求項1記載の剤。
12. 抗体が、BA-27（FERM BP-4139）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体BA-27aである請求項1記載の剤。
13. 抗体が、BC-05（FERM BP-4457）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体BC-05aである請求項1記載の剤。
14. 抗体が、脳血液関門を透過する抗体である請求項1記載の剤。
15. 抗体が、形成された老人斑から β -アミロイドを引き抜きうる抗体である請求項14記載の剤。
16. β -アミロイドの脳内での凝集または沈着の抑制剤である請求項1記載の剤。
17. 配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの血中濃度を特異的に上昇させうる請求項1記載の剤。
18. 抗体が、脳血液関門を透過しない抗体である請求項1記載の剤。
19. 抗体が、末梢中の β -アミロイドを末梢で捕捉しうる抗体である請求項18記載の剤。
20. 哺乳動物に対して、 β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療方法。
21. アルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤を製造するための、 β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の使用。

22. 抗体が、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-42）を認識するが、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-38）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-39）および配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-40）を認識しない抗体である請求項1記載の剤。

[SEQUENCE LISTING]

<110> Takada Chemical Industries, Ltd.

<120> Use of antibody

<130> P04-146PCT

<150> JP2003-317443

<151> 2003-09-09

<160> 9

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5				10						15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25						30	
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly										
				35											

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5				10						15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25						30	
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val									

35

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25						30	
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val								
				35				40							

<210> 4

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25						30	
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile							
				35				40							

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile

20 25 30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 6

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
35 40

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
20 25

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/395, A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/395, A61P25/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94/17197 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 04 August, 1994 (04.08.94), Full text & EP 683234 A & EP 1308461 A & US 5750349 A	1-19, 21-22
Y	Frederique Bard et al., Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, Nature Medicine, Vol.6, No.8, 2000, pages 916 to 919	1-19, 21-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 December, 2004 (01.12.04)

Date of mailing of the international search report
21 December, 2004 (21.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013397

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ronald B. Demattos et al., Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease, PNAS, Vol.98, No.15, pages 8850 to 8855, 2001	1-19,21-22
Y	Dodart JC. et al., Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model, Nat. Neurosci., Vol.5, No.5, pages 452 to 457, 2002	1-19,21-22
Y	Donna M. Wilcock et al., Intracranially Administered Anti-A β Antibodies Reduce β -Amyloid Deposition by Mechanisms Both Independent of and Associated with Microglial Activation, The Journal of Neuroscience, Vol.23, No.9, pages 3745 to 3751, 01 May, 2003 (01.05.03)	1-19,21-22
A	Christoph Hock et al., Generation of antibodies specific for β -amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease, Nature medicine, Vol.8, No.11, pages 1270 to 1275, 2002	1-19,21-22
A	Anne K. et al., β -Amyloid Peptide Vaccination Results in Marked Changes in Serum and Brain A β Levels in APPswe/PS1 Δ E9 Mice, as Detected by SELDI-TOF-Based Protein Chip® Technology, DNA AND CELL BIOLOGY, Vol.20, No.11, pages 713 to 721, 2001	1-19,21-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013397

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 20 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet.)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013397

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K 39/395, A61P 25/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K 39/395, A61P 25/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 94/17197 A (武田薬品工業株式会社) 1994.08.04, 全文 &EP 683234 A &EP 1308461 A &US 5750349 A	1-19, 21-22
Y	Frederique Bard et al., Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, Nature Medicine, Vol.6, No.8, 2000, p.916-919	1-19, 21-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.12.2004

国際調査報告の発送日

21.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Ronald B. DeMattos et al., Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease, PNAS, Vol.98, No.15, p.8850-8855, 2001	1-19, 21-22
Y	Dodart JC et al., Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model, Nat. Neurosci., Vol.5, No.5, p.452-457, 2002	1-19, 21-22
Y	Donna M. Wilcock et al., Intracranially Administered Anti-A β Antibodies Reduce β -Amyloid Deposition by Mechanisms Both Independent of and Associated with Microglial Activation, The Journal of Neuroscience, Vol.23, No.9, p.3745-3751, 2003.05.01	1-19, 21-22
A	Christoph Hock et al., Generation of antibodies specific for β -amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease, Nature medicine, Vol.8, No.11, p.1270-1275, 2002	1-19, 21-22
A	Anne K. et al., β -Amyloid Peptide Vaccination Results in Marked Changes in Serum and Brain A β Levels in APPswe/PS1 Δ E9 Mice, as Detected by SELDI-TOF-Based ProteinChip® Technology, DNA AND CELL BIOLOGY, Vol.20, No.11, p.713-721, 2001	1-19, 21-22

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 20 に記載のものは、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。